

10/500748
DT15 Rec'd PCT/PTO 29 JUN 2004

【명세서】

【발명의 명칭】

지에프피 유전자가 발현되는 돼지, 또는 지티 유전자가 제거된 복제돼지 및 이들의 생산방법{GFP-TRANSFECTED CLON PIG, GT KNOCK-OUT
5 CLON PIG AND METHODS FOR PRODUCTION THEREOF}

【기술분야】

본 발명은 돼지에 있어서, 원하는 유전자의 체세포 내 도입
(transfection) 및 적중(targeting) 기술과 유전자가 도입된 체세포의 핵이식
기술을 이용하여 특정 유전형질을 지닌 복제돼지를 생산하는 방법 및 이러한
10 방법에 의해 생산된 돼지에 관한 것이다.

보다 구체적으로, 본 발명은 특정 유전자 즉, 특정 범위 파장의 빛에서
초록색을 발현하는 유전자, 구체적으로는 GFP(Green Fluorescent Protein)유
전자가 도입된 복제돼지 및 이것의 생산방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은
면역거부반응관련 유전자, 구체적으로 GT($\alpha 1,3$ galactosyltransferase) 유전자
15 가 제거된 복제돼지 및 이것의 생산방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 GFP유전자 또는 조작된 GT유전자를 세포에 효율적으
로 도입하여 적중시키는 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 GT 유전자를 이용하여 효율적으로 제거할 수 있는 벡
터에 관한 것이다.

20 특히, 본 발명은 외래성 유전자, 즉 GFP유전자의 성공적 도입에 의해
질환모델 동물의 대량 생산가능성을 시사하며, GT유전자가 제거된 돼지의 생
산이 가능하게 됨으로서 돼지의 장기를 초급성 면역거부반응(hyperacute

xenograft rejection)없이 이식 가능하게 한다.

【배경기술】

형질전환동물(transgenic animals)을 생산하는 기술은 지난 20년간 가장 각광받고 있는 기술분야 중 하나이다. 상업적 유용성뿐 아니라, 생체의학과 생물학 연구에 있어서도 그 중요성은 압도적이다. 형질전환동물 생산기술의 산업적 적용분야는 고품질의 축산식품 생산, 고부가가치의 약리활성물질 생산, 각종 병원균에 대한 생체저항력 향상동물 생산, 질환모델동물의 생산 및 유전자치료 분야에 이르기까지 매우 광범위하다.

10 형질전환동물 생산을 위한 유전자도입 기술의 기본 단계로 GFP 유전자의 적중은 염색체 단백질 표지 및 특정 염색체 부위의 태깅(tagging)의 용이성, 세포질의 많은 단백질과 결합이 가능하며 그 무해성으로 인하여 살아있는 세포에서 같은 성질의 세포골격사(cognate cytoskeletal filaments)를 발현시키
15 데 많이 이용되고 있다. 1994년 샬피(Chalfie) 등은 해파리(Aequorea victoria)에서 얻은 GFP를 형광성 단백질 인식지표로 적용하여 돼지의 배아를 비롯한 살아있는 세포의 다양한 분자생물학적 변화를 관찰하였다. 이후 더욱 기능이 향상된 EGFP(enhanced GFP)가 개발되어 여러 동물에서 마커 유전자(marker gene)로 이용되고 있다.

이러한 형질전환 동물생산을 위한 외래 유전자도입 방법으로 고든
20 (Gordon) 등이 제시한 전핵내 미세주입법(pronuclear microinjection)이 있는데 이 방법은 외래유전자를 수정란의 전핵에 직접주입하는 방법으로 마우스를 비롯한 실험동물에서 많이 이용되고 있지만 산업동물에서는 극히 낮은 생산

효율(소 0.5 %, 돼지 1.5 %, 양 2.5 %)과 모자이크증(Mosaicism)이 대부분의
경우에 나타나는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 외래유전자가 도입된 형질
전환체세포를 이용한 동물복제기술이 대안으로 제시되고 있다. 형질전환동물
복제기술은 유전자가 도입된 세포만을 핵이식함으로써 모자이크증이 없는
5 100% 형질전환 복제수정란을 생산하여 대리모이식을 통해 형질전환복제동물
을 효율적으로 생산할 수 있다. 또한 이 과정에서 체세포의 성을 미리 판별하
여 인위적으로 태어나는 복제동물의 성을 조절할 수 있어 산업적 유용성이 극
대화 될 수 있다.

체세포 복제 기법에 의한 형질전환돼지의 생산을 위해서는 먼저 원하는
10 유전자의 분리 및 유전자도입 벡터의 제작과 유전자를 체세포에 도입하는 분
자생물학적 기술과 체세포 복제기술을 융합해야 한다. 유전자 분리를 위해 돼
지 게놈 DNA 라이브러리를 스크리닝하는 방법이 많이 이용되고 있다. 유전
자도입 벡터는 외인성 프로모터의 유무, 유전자의 크기 및 양성/음성 선택표지
인자 유무 등을 고려하여 목적에 따라 다른 형태의 벡터가 제작되고 있다. 유
15 전자 도입기술은 원하는 유전자를 핵공여세포내로 트랜스펙션(transfection)하
는 것으로 생화학적 방법(biochemical method), 물리적 방법(physical
method), 바이러스 매개 트랜스펙션 방법(virus mediated transfection
method)등이 있다. 생화학적 방법으로는 칼슘을 매개체로 하는 칼슘침전법,
세포막 성분인 양이온 리피드를 매개체로 하는 리포펙션(lipofection) 또는 리피
20 드는 아니지만 양전하를 지니는 폴리머를 매개체로 하는 방법등이 있는데, 이
는 실험의 용이성과 효율성 및 안정성 측면에서 많이 이용되고 있다. 물리적
방법으로 일렉트로포레이션(electroporation), 유전자 총(gene gun), 세포내 직

접 미세주입법등이 있다. 바이러스-매개 방법으로는 아데노바이러스(adenovirus)나 레트로바이러스(retrovirus)의 바이러스 게놈(virus genome)에 원하는 DNA를 클론닝하여 세포에 감염시키는 방법이다. 체세포복제기술은 본출원인에 의해 2000년 6월 30일에 출원된 국제특허출원 PCT/KR00/00707의

- 5 "체세포 복제동물 및 그 생산방법이 이용되는데 즉, 먼저 탈핵(enucleation)과정에 의해 유전물질(genetic material)을 포함한 핵이 제거된 미수정란에 다른 세포의 핵(nucleus)을 주입함으로써 이루어진다. 이렇게 생산된 수정란을 "복제수정란(reconstructed embryo)"이라 하는데, 이 복제수정란을 후활성화시키고 체외배양을 거쳐 발육된 핵이식 수정란을 대리모에 이식하여 산자를 생산
- 10 한다.

- 인간의 장기이식술은 인간 장기에 관련된 불치, 난치 질환을 치료하는 유용한 수단이며 과거 10여년간 장기이식 수술에는 점차 증가하였다. 그럼에도 불구하고 같은 기간의 미국 내 수술 대기자 수는 3배가 증가하였다. 이와 같은 현상은 수요와 공급의 불균형에 의한 것으로 인간의 장기 부족 현상을
- 15 초래하였다. 이와 같이 장기 이식수술에서 장기공급원이 절대적으로 부족하지만 이를 해결할 만족스런 방법은 아직도 없는 형편이다. 이와 같은 장기부족 문제를 해결하는 방안으로 의공학적 접근법에 의한 인공장기의 개발과 형질전환동물의 생산 등이 있다. 이 중에서 형질전환동물에서 공급받기 위해서는 일반적으로 돼지가 장기공여동물로 선택된다. 그 이유는 인간의 그것과 생리학적
- 20 유사성과 장거나 혈관계의 크기, 심지어 적혈구의 지름크기 및 모세혈관의 크기가 인간의 그것과 유사하며 윤리적으로 영장류를 이용하는 것보다 용이하기 때문이다.

하지만, 돼지의 장기를 인체에 이식하면 초급성거부반응이 일어나 이식 받은 환자에 심각한 부작용이 발생되어 실패하게 되는데 이는 돼지의 세포나 조직의 주된 이종항원이 인간의 혈장 내에 존재하는 갈(Gal) 에피통(epitope)이라는 이종항체에 감작되기 때문이다. 이러한 면역거부반응을 극복하기 위해

5 서 여러가지 방안이 제시되어 왔는데, 인체 내의 보체활성을 억제시키기 위한 유전자 조작기술 또는 인체의 면역기작의 활성을 떨어뜨리기 위한 지속적인 약물복용의 방법 등이 있으나 그 효과는 그리 뛰어나지 못하였다. 즉, 인체의 면역능력을 떨어뜨려 미생물이나 바이러스 등의 침입에 의해 쉽게 감염되는 문제가 발생하게 된다. 하지만 본원 발명은 면역거부반응의 근원적인 해결책으

10 로 문제가 되는 이종항원 GT 유전자적중기술로 사전에 제거하여 인간의 면역능력을 떨어뜨리지 않으면서 면역거부 반응이 없이 장기를 이식받을 수 있다.

【발명의 상세한 설명】

본 발명은 상기에서와 같은 선행기술들을 토대로 하여 유전자적중 및 도입기술과 체세포복제기술을 이용하여, GFP 유전자를 발현하는 복제돼지 및

15 GT유전자가 제거된 복제돼지를 생산하는 방법 및 이러한 방법에 의해 생산된 돼지를 제공한다. 이하, 구체적으로 본 발명을 설명한다.

본 발명은 체세포 단계에서, 특정 유전자의 도입 및 적중기술과 체세포 핵이식 기술을 병합하여, 원하는 유전자가 발현 또는 제거되는 형질전환 복제돼지를 제공하는 것을 특징으로 한다.

20 좀 더 구체적으로, 본 발명은 유전자 도입기술을 이용하여 GFP가 도입된 또는 GT유전자가 제거된 체세포를 핵이식 기술을 이용하여 GFP 발현 또는 GT 유전자가 제거된 형질전환 복제돼지를 제공한다.

- 먼저, GFP 발현 복제 돼지를 생산하는 방법은 (a) 돼지에서 채취하여 배양한 세포주를 핵공여세포로 준비하는 단계; (b) GFP 유전자를 포함하는 DNA 구조체와 리피드 성분 또는 비리피드 양전하 폴리머 매개체를 혼합하여 리피드(또는 양전하 폴리머)-DNA 구조 복합체를 형성시킨 후, 상기 리피드 (또는 양전하 폴리머)-DNA 구조 복합체를 상기 핵공여 세포배양액에 첨가 후 배양하여 상기 GFP 유전자를 상기 핵공여 세포에 도입하여 발현시키는 단계; (c) 상기의 GFP 유전자가 도입된 핵공여 세포를 탈핵된 돼지 수핵난에 이식하여 형질전환된 핵이식란을 생산하고, 활성화시키는 단계; 및 (d) 상기 핵이식란을 대리모에 이식하여 산자를 생산하는 단계를 포함한다.
- 10 이하에서는, 상기의 GFP 유전자가 발현되는 복제돼지의 생산방법을 단계별로 나누어 보다 구체적으로 설명한다.

제1단계: 핵공여세포의 준비, 체외배양 및 유지

- 체세포 핵이식 기술에 의한 GFP 유전자를 발현하는 형질전환동물의 생산에는 핵공여세포가 필요하다. 핵이식시 이용되는 공여세포에는 체세포 유래 및 수정란 유래 세포 등 여러 종류가 있지만, 돼지의 태아에서 분리한 섬유아 세포를 이용한다. 이 세포의 특징은 초기 분리시 다수의 세포를 얻을 수 있고, 세포 배양도 비교적 쉬우며 체외에서 배양 및 조작이 용이하다는 장점을 지니고 있다.
- 20 핵공여세포로 주로 이용되는 태아 섬유아세포를 분리하기 위하여, 임신 돼지에서 채취한 돼지 태아의 체장(crown-rump)길이를 측정하며 번식기록부와 대조하여 임신 일령을 산정한다. 돼지 태아를 태막으로부터 분리하고 탯줄

도 태아에 근접한 부위에서 제거한다. 이 후 분리된 태아를 항생제와 소혈청알부민(BSA; bovine serum albumin)이 함유된 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline; PBS)에서 수 회 세척한다. 수술용 기구로 태아의 사지와 두부 및 내부 장기를 제거하고 다시 PBS로 세척한다. 조직으로부터의 세포분리
5 는 남은 조직을 기계적으로 잘게 분쇄한 후 바로 조직편(explant)배양에 의해 세포를 분리하거나, 효소(trypsin-EDTA)를 이용하여 유리된 세포를 얻는 방법으로 태아 섬유아세포(fetal fibroblast)를 분리한다. 핵공여세포의 배양은 38℃ 및 95%의 습도인 항온 및 항습과 5% CO₂ 와 95% 공기의 조건으로 조성된 배양기에서 실시한다. 배양 후 핵공여세포가 배양 용기에 90-100% 증식
10 (confluent)하면 제대 배양을 실시하고, 잉여분은 동결하여 보존한다.

제2단계: GFP 유전자의 체세포 도입 및 적중

GFP 유전자의 도입 및 적중에 있어서 사용된 벡터는 상업적으로 시판되고 있는 pEGFP-N1(Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA)을 이용하였다. pEGFP-N1은 포유동물의 세포에서 밝은 형광과 높은 발현을 위한 와일드-타입 GFP(wild-type GFP)의 변형 GFP이다. 생화학적 도입매개체로 퓨진 6 (FuGENE 6, Roche Diagnostics Corp. IN, USA), 리포펙타민 플러스 (LipofectAmine Plus, Life Technologies) 및 엑스진 500(ExGen 500, MBI Fermentas)을 이용하였다. 퓨진6는 다성분 지방계 시약(multi-component
15 lipid based reagent)으로서 다양한 세포타입에서 높은 도입 효율을 가지고 세포독성이 없으며 혈청 첨가여부에 관계없이 기능을 발휘하고 최소한의 최적화 작업이 쉬운 장점을 지닌다. 리포펙타민 플러스는 양전하 지방(cationic lipid)
20

이며 엑스진 500은 비지방 양전하 중합체(non lipid cationic polymer)로 여러 가지 세포타입에서 높은 효율이 보고되었다.

유전자 도입에 이용될 세포는 최적조건에서 성장시킨 후 효소처리 (trypsin-EDTA)를 통해 단세포로 만들어 계대배양하며 최소한 실험 하루 전
5 에 신선한 배양액으로 교체하고, 실시 4시간 전에 다시 신선한 배양액을 공급 한다. 생화학적 매개체에 따라 최적의 세포밀도가 될때까지 세포를 배양하여 유전자를 도입시킨다.

본 발명에서는 GFP 유전자의 도입 및 적중을 위하여 리피드 및 비리피 드 계통의 생화학적 매개체를 이용하였다. GFP 유전자를 리피드 및 비리피드
10 매개체와 혼합하여 복합체(complex)를 형성하고 이 복합체를 핵공여세포내로 도입시켰다. 유전자의 세포내 도입을 효과적으로 하기 위해 매개체에 따라 GFP 유전자의 양, 매개체의 부피, 세포밀도, 도입시간, 혈청사용 여부등 여러 가지 변수를 선정하고 각 변수(parameter)들을 최적화하여 GFP 유전자의 도입 및 발현을 극대화하였다.

15

제3단계: GFP 유전자가 도입된 핵공여세포의 선별, 증식 및 동결보존

GFP 유전자의 세포내 도입 후 세포가 완전증식(confluency)이 될 때까지 새로운 배지에서 3-5일간 배양하여 GFP 유전자의 염색체내 도입을 유도한 후 효소처리에 의해 단세포로 만든다. 이러한 단세포들을 현미경 상에서 자외
20 선 필터를 이용하여 관찰하여 초록색을 띄우는 세포만을 선별하여 핵이식에 이용한다. 또한 GFP유전자가 도입된 핵공여세포를 항생제를 이용하여 선별한다. GFP 유전자 벡터에 이용된 양성 마커(positive marker)인 네오마이신

(neomycin) 저항유전자는 GFP 유전자와 함께 세포내로 도입되어 발현되면 네오마이신 저항성단백질을 생산한다. 따라서 적중된 세포를 항생제가 포함된 세포배양액에 배양하면 GFP 유전자 벡터가 도입된 세포는 생존하게 되고, 그 외의 세포들은 항생제의 독성에 의해 사멸되어 일정 시간 후 배양 용기에는 유전자

5 전자가 적중된 세포만 증식한다(도1). 이와 같은 항생제에 의한 선별은 항생제의 적정 선별 농도를 정함으로서 효과적으로 이루어지도록 한다. 네오마이신(neomycin)을 200ug/ml ~ 800ug/ml 의 농도로 4-5일간 첨가하여 세포를 2-3주간 배양하여 적중된 세포들을 선별할 수 있다. 핵공여세포의 종류에 따라 차이가 있으나, 적중된 세포는 하나의 세포로부터 증식을 시작하게 되므로 다음 단계의 확인을 위해서는 일정 수 이상으로 증식시켜야 한다. 항생제를 통한 선별 과정이 이루어지면 정상 배양으로 전환하고, 세포의 신속한 증식과 배양 시 세포 사멸에 의한 불필요한 손실을 감소시키기 위해 적절한 성장인자와 세포사멸 억제제 등을 첨가하는 방법을 적용한다. 증식 배양한 세포의 효율적 보존을 위해 최적 조건을 확립하여 각 단계마다 동결을 실시한다.

15

제4단계: 체세포의 핵이식을 통한 복제수정란의 생산

본 발명은 상기 전 단계에서 형질전환된 핵공여세포의 형질을 그대로 지닌 동물을 생산하기 위해 체세포 핵이식을 통한 복제기술을 접목한다. 즉, 복제수정란을 생산한다. 먼저, 수핵 난자를 선별해야 하는데, 미성숙 난자를 체

20 외에서 성숙시켜 이용한다. 주로 도축장에서 돼지의 난소를 채취하고 집란하여 3회의 세정을 거쳐, 소혈청알부민이 없는 성숙용 NCSU23(North Carolina State University 23; NCSU23-M, 참조: 표1)에 10% 돼지 난포액(porcine

follicular fluid; PFF), 성선자극호르몬(gonadotropic hormone; GTH, pregnant mare serum gonadotropin; PMSG, Intervet Folligon, hCG-Intervet, Chorulon), 10ng/ml의 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF)를 첨가한 체외성숙 배지에서 배양한다.

- 5 이렇게 배양된 수핵난자 및 핵공여세포를 준비하고, 절개용, 탈핵 및 주입용의 피펫을 준비한다. 배양액의 준비과정에서, 모든 작업은 세정용 NSCU23(NCSU23-W, 참조: 표2)을 기초 배양액으로 이용한다. 수핵난자를 0.1% 히알루로니다아제 (hyaluronidase)가 첨가된 NCSU23-W 내에 난자를 분주하여 난구세포를 벗겨낸다. 완전히 벗겨진 난자는 NCSU23-W 미소적 내
- 10 에서 세정한다.

- 세정이 끝난 난자를 고정용 피펫으로 고정하고, 예리한 피펫으로 제1극 체 상부의 투명대에 절개창을 만든다. 고정용 피펫으로 수핵난자를 고정시키고 투명대 절개창 제조에 이용된 피펫으로 절개창과 제1극체가 잘 보이는 위치에서 스퀴징(squeezing) 방법으로 극체와 세포질 일부를 제거하여 탈핵시킨다.
- 15 탈핵 후 난자는 NCSU23-W로 세정하고 핵이식 전까지 NCSU23-M 미소적에 정치시켜 둔다. 핵공여세포를 준비하고, 이를 탈핵된 수핵난자의 주란강에 주입한다. 이때 절개창을 양 피펫과 일직선상에 놓고 주입용 피펫으로 핵공여세포를 흡입하여 절개창을 통해 핵공여세포를 주란강에 주입함으로써 핵이식란을 작성한다(도2).

- 20 이렇게 하여 형성된 핵이식란은 비.티.엑스 세포조작기(BTX Electro cell manipulator, ECM 2001, BTX, USA)에 1.8kV/cm의 직류전압에서 30 μ s의 통전시간으로 단일통전으로 전기적 세포융합을 시도한다. 융합이 확인된 수

정란은 NCSU23-W로 옮겨 세정한다. 그 후 배양용 NCSU23(NCSU23-D, 참조: 표3)로 옮겨 배양한다. 배양 4일째에 NCSU23-D에다 혈청을 10%가 되게 첨가하여 재배양한 후 7일째에 배반포로의 발생 및 GFP 발현 여부를 확인한다(도3).

5 【표 1】

NCSU-M

성 분	농도
NaCl	108.73mM
KCl	4.78mM
HEPES	10mM
CaCl ₂	1.70mM
KH ₂ PO ₄	1.19mM
MgSO ₄	1.19mM
NaHCO ₃	25.07mM
Glucose	5.55mM
Glutamine	1.00mM
FCS	10%(v/v)

【표 2】

NCSU-W

성분	농도
NaCl	108.73mM
KCl	4.78mM
HEPES	10mM
CaCl ₂	1.70mM
KH ₂ PO ₄	1.19mM
MgSO ₄	1.19mM
NaHCO ₃	25.07mM
Glucose	5.55mM
Taurine	7.00mM
Hypotaurine	5.00mM
Glutamine	1.00mM
FCS	10%(v/v)

【표 3】

NCSU-D

성분	농도
NaCl	108.73mM
KCl	4.78mM
CaCl ₂	1.70mM
KH ₂ PO ₄	1.19mM
MgSO ₄	1.19mM
NaHCO ₃	25.07mM
Glucose	5.55mM
Taurine	7.00mM
Hypotaurine	5.00mM
Glutamine	1.00mM
FCS	10%(v/v)

제5단계: 복제수정란의 대리모 이식 및 산자생산

5 복제수정란을 이식하여 정상적으로 태아로 발생시킬 수 있는 대리모를 선발한다. 경산돼지 중 발정기를 파악하여 이식적기를 선정한다. 일반적으로, 적당한 수정시기는 발정 징후를 보이기 시작하고부터 대략 30~40시간 후이므로 복제 수정란의 대리모 이식은 이로부터 계산하여 복제 수정란의 체외발육 단계에 맞추어 정한다.

10 복제수정란의 대리모 이식은 개복수술에 의하여 난소쪽의 수란관 2cm 내에 주입한다(도4). 핵이식란의 이식 후 4주째에 초음파 검사를 실시하여 임신여부를 확인한다. 이 후에도 2주일 간격으로 초음파검사를 통하여 임신지속

여부 및 태아의 발육상태 등을 확인한다.

태아의 출산은 분만간격이 30분 이상이 지났는데도 새끼돼지가 태어나지 않으면 분만을 도와야 하며, 분만 예정일이 지난 모돈은 호르몬 제제 주사 또는 제왕절개와 같은 수술방법을 통하여 산자를 생산하게 된다.

5

상기의 방법으로, 돼지 태아섬유아세포를 핵공여세포로 하여 GFP 유전자가 도입된 체세포를 핵이 제거된 수핵난자에 핵이식하고 이를 7일간 체외배양하여 정상적으로 배반포 단계로 발육되었고 GFP도 발현된 복제수정란을 에스엔유-피1(돼지 엔티 배아, SNU-P1[Porcine NT Embryo])으로 명명하여, 이를 2001년 12월 27일자로 국제기탁기관인 한국생명공학연구원(KRIBB) 유전자 은행(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52 소재)에 기탁번호 'KTCT 10145 BP'로 기탁하였고, 상기 기탁된 핵이식란 SNU-P1를 대리모에 이식하여 정상 산자를 생산한다.

한편, GT 유전자가 제거된 복제돼지를 생산하는 방법은, (a) 돼지에서 채취하여 배양한 세포주를 핵공여 세포로 준비하는 단계; (b) 돼지 게놈 BAC 라이브러리로부터 GT 유전자 클론을 분리한 후, 상기 GT 유전자 클론을 이용하여, GT 유전자의 단백질발현부위 일부분에서 상동재조합을 통하여 GT 단백질 발현부위를 표지 유전자로 대체하여 정상적인 GT 단백질이 발현되지 않도록 하는 유전자 적중용 벡터를 작제하는 단계; (c) 상기의 유전자 적중 벡터를 리피드 또는 비리피드 성분과 혼합하여 복합체를 형성시킨 후, 상기 복합체를 상기 핵공여 세포배양액에 첨가하여 상기 재조합 GT 유전자를 핵공여 세포내에 도입하여 적중시키는 단계; (d) 상기 재조합 GT 유전자가 도입된

핵공여 세포를 탈핵된 돼지 수핵난에 이식하여 형질전환된 핵이식란을 생산하고, 활성화시키는 단계; 및 (e) 상기 핵이식란을 대리모에 이식하여 산자를 생산하는 단계를 포함한다.

이하에서는, GT 유전자가 제거된 복제돼지의 생산방법을 단계별로 나누어 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

제1단계: 핵 공여세포의 준비, 체외배양 및 유지

체세포 핵이식 기술에 의한 GT 유전자를 제거시킨 형질전환동물의 생산에는 핵공여세포가 필요한데, 이 과정은 상기 GFP 발현 복제돼지 생산을 위한 제 1단계와 동일하게 수행된다.

제 2단계: GT 유전자의 분리

총 3개의 풀(pools)로 구성되어 있는 돼지 게노믹 BAC 라이브러리(pig genomic BAC library)를 영국 HGMP(Human Genome Mapping Project)사에서 구입한 후 이를 스크리닝(screening) 하여 GT 유전자를 분리한다. 라이브러리 스크리닝 전 단계로 돼지 GT cDNA(승인번호 : AF221517)를 바탕으로 작성한 프라이머(primer)와 돼지 게노믹 DNA를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하여 양성 신호(positive signal)을 얻음으로써 프라이머의 정확성 및 중합효소연쇄반응 방법을 검증한다. 검증된 방법으로 3개의 돼지 BAC 게노믹 라이브러리 풀을 스크리닝하여 원하는 크기의 중합효소연쇄반응 산물이 얻어지는 단일클론을 얻는다. 그후 통상적인 서던블랏(Southern blot) 법을 이용하여 GT 유전자 클론을 검정한다.

제3단계: GT 제거된 벡터 제작 및 핵공여세포로의 도입

위에서 분리된 GT 유전자 클론을 이용하여 유전자 적중용 벡터를 작제한다. 즉, GT 유전자의 단백질 발현 부위 일부분을 대치한 표지유전자가 상동 재조합 (homologous recombination)을 통하여 GT 단백질 발현부위를 대치하여 정상적인 GT 단백질이 발현되지 않도록 적중벡터를 작제한다. 적중된 세포의 선별 효율을 높이기 위해 적중 벡터는 외인성 프로모터(exogenous promoter)를 지니지 않도록, 즉 프로모터 트랩(promoter trap) 방법을 이용한다. 적중 벡터는 GT 유전자중 인트론(intron) 8의 일부분, 단백질 발현 부위(엑손[Exon] 9), 및 인트론 9의 일부 서열을 포함하는 상동 절편과, GT 유전자의 단백질 발현 부위 중 Ava I 과 Dra III 제한효소로 절단된 단편의 아미노산 서열에 해당하는 유전자의 염기서열을 대치하는 푸로마이신 저항유전자 발현부위-SV40 폴리(A) 서열을 포함한다. 이러한 적중벡터는 상동 절편에서는 상동 재조합이 일어나 푸로마이신 저항유전자 발현부위-SV40 폴리(A) 서열 부위가 정상적인 엑손에 삽입되어 GT 유전자를 파괴한다(도9). 상기 적중 벡터를 핵공여세포로 GFP 형질전환 동물 생산방법에서 언급된 튜진6을 이용하여 도입한다. 적중벡터가 도입된 체세포는 적절한 항생제가 포함된 배지에서 1 - 2주일 동안 배양하여 선별한 후 적중 여부를 서던블랏 또는 중합효소연쇄반응 등의 통상적인 방법으로 확인한다.

제4단계:체세포의 핵이식을 통한 복제수정란의 생산

상기 GFP 발현 복제돼지 생산의 제 4단계와 동일하게 수행된다.

제5단계: 복제수정란의 대리모 이식 및 산자생산

상기 GFP 발현 복제돼지 생산의 제 5단계와 동일하게 수행된다.

상기한 방법으로 돼지 태아섬유아세포를 핵공여세포로 하여 GT 유전자
5 가 제거시켜 핵을 이식한, 배반포 단계의 돼지 복제 수정란을 에스엔유-피
2(돼지 엔티 배아)(SNU-P2[Porcine NT Embryo])로 명명하여, 이를 2001년
12월 27일자로 국제기탁기관인 한국생명공학연구원(KRIBB) 유전자 은행
(KCTC, 대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52 소재)에 기탁번호 'KCTC
10146BP'로 기탁하였고, 상기 기탁된 핵이식란 SNU-P2를 대리모에 이식하
10 여 정상 산자를 생산한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 배양중인 GFP 발현 체세포의 사진이다.

도 2는 GFP 발현 체세포를 수핵난자에 이식한 핵이식란의 사진이다.

도 3은 GFP가 발현되는 돼지 배반포핵이식란의 사진이다.

15 도 4는 형질전환된 핵이식란을 대리모의 난관 내에 이식하는 사진이다.

도 5는 1차 풀 돼지 BAC 게노믹 라이브러리의 1차 스크리닝 결과사진
이다.

도 6은 2차 풀 돼지 BAC 게노믹 라이브러리의 2차 스크리닝 결과사진
이다.

20 도 7은 3차 풀 돼지 BAC 게노믹 라이브러리의 3차 스크리닝 결과사진
이다.

도 8은 클론된 GT 유전자의 제한효소 맵핑 사진이다.

도 9는 GT 유전자적중벡터의 모식도이다.

【실시예】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다.

이들 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본
5 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 제한되지 않는다는 것은
당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 핵 공여세포의 준비, 핵 공여세포의 체외배양 및 유지

임신된 돼지자궁을 채취한 후 무균상태로 실험실로 옮겨온다. 생후 30
10 일령, 체장 25mm 정도의 태아를 주로 이용하며 양막에 쌓여 있는 태아를 무
균적으로 분리한다. 분리된 태아의 머리, 사지 및 복강내부장기를 제거한 다음
항생제와 항균제가 첨가된 인산완충액으로 수회 세정한다. 0.25% 트립신 이.디.
티.에이(trypsin-EDTA)가 들어있는 디쉬에서 외과용 가위를 이용하여 태아
조직을 분리한다. 분리된 태아 조직을 38℃, 5% CO₂ 세포 배양기에 30분 정
15 도 배양한다. 이후 수회 원심분리로 트립신을 세척하고 소태아혈청이 10% 함
유된 세포배양배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)에서 배양한
다. 분리 후 배양 디쉬에 세포가 90-100% 증식하면 일부는 계대 배양을 하고
잉여세포는 동결한다. 세포의 동결은 체세포 핵이식의 핵공여세포로 장기간 이
용하기 위한 목적이며, 배양을 하는 경우 세포의 질을 향상시키기 위하여 성장
20 인자와 세포사멸 억제제를 첨가한 배양액을 이용한다.

실시예 2: GT유전자의 분리

돼지 게놈 라이브러리(Pig genome library)에서 GT의 시그널을 검색하기 전에, 양성 대조군으로서, 랜드레이스(Landrace) 품종의 6개월령 돼지 자궁 중 약 5g을 잘게 잘라 액체 질소를 넣은 약사발에 넣고 조직을 파쇄시킨다.

5 단백질용해제 K(proteinase K)를 11mg/ml의 농도로 처리한 후 폐놀 추출을 통하여 돼지 게놈 DNA를 준비한다.

돼지 GT 스크리닝을 위하여 돼지 BAC 게노믹 라이브러리를 구입하였다. 최종 단일 클론을 분리하기 위해 단계별로 총 세 개의 풀(pools)로 구성되어 있는 라이브러리를 스크리닝해야 하며, 각각의 풀의 구성은 다음과 같다.

10 제1풀은 A에서 R (K제외)까지 17 바이알(vials)로 구성되어 있으며, 제2풀은 96-웰 마이크로플레이트(microplate)에 각 15개의 풀이고 제3풀은 각 384-웰 마이크로플레이트로 구성되어 있다. 먼저 돼지 게노믹 DNA(100ng/ μ l)를 이용하여 원하는 크기의 양성 GT 신호를 찾기 위해 돼지 GT cDNA (송인번호 : AF221517)에서 유래된 프라이머를 제작하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다.

15 이때 이용된 프라이머는 돼지 GT5(5 - GAT CAA GTC CGA GAA GAG GTG GCA A 3)와 돼지 GT3(5 TCC TGG AGG ATT CCC TTG AAG CAC T 3)로서 두 가지 프라이머를 이용하여 증폭되는 산물의 크기는 342bp이다. 위 증폭산물을 생성하기 위하여 이용되는 중합효소연쇄반응은 1U의 내열성 DNA 중합효소, 10mM dNTPs, 200mM Tris-Cl(pH 8.8), 100mM KCl, 100mM

20 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% TritonX-100, 1mg/ml BSA, 주형으로 100ng/ μ l 게노믹 DNA 및 2 μ l 프라이머(40 pmol/ μ l 센스프라이머, 40pmol/ μ l 안티센스프라이머)로 구성되어 있으며 총 부피는 20 μ l 이다. PCR 조건은 첫 주기(cycle)에서 95 $^{\circ}\text{C}$

5분간 변성단계, 두 번째 주기(cycle)부터는 95℃ 1분 변성, 55℃ 1분간 서냉 복원(annealing), 72℃ 1분 30초간 중합화(polymerization)로 구성된 사이클을 40회 반복하였으며, 마지막 사이클에서 72℃ 15분간 증폭(extension)을 시행하였고, 증폭된 산물은 겔 전기영동과정을 통하여 확인하였다.

5 돼지 게노믹 DNA(100ng/ μ l)를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 342bp의 산물(product)을 확인할 수 있었으며 이를 양성 대조군으로 하여 제 1차로 돼지 BAC 게노믹 라이브러리 제1 풀(A-R, K제외, 총 17개)을 돼지 GT5와 돼지 GT3 프라이머를 이용하여 게노믹 DNA와 동일한 조건에서 PCR을 시행한 결과 게노믹 DNA와 마찬가지로의 342bp 크기(size)의 산물
10 (product)을 F, G 풀(pool)에서 얻었다(도5). 제1 풀에서 양성 시그널이 나타난 F, G 풀의 제2 풀(secondary pool)(F : 76-90, G : 91-105로 구성, 각 15개)을 위와 동일한 조건에서 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 F, G 각각의 제2 풀(secondary pool)에서 게노믹 DNA와 동일한 산물(product)을 얻었다. 또한 F 풀(pool)은 81, 88번에서, G 풀(pool)은 91번에서 342bp의 PCR 산물
15 (product)을 확인할 수 있었다 (도6). 이 중 시그널(signal)이 가장 강하게 나타난 88번 풀(pool)의 384개의 각각의 단일 클론으로 구성된 제3 풀(tertiary pool) (384-well microplate, 1A-24P)을 이용하여 PCR을 시행한 결과 8F에서 게노믹 DNA와 동일한 시그널(signal)이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도7).

20

실시예 3: GT 제거된 벡터 제작

돼지 GT의 대략적인 절단 맵핑은 돼지 GT 엑손9 유전자(승인번호;

AF221517, 3.9kb)를 웹커터 프로그램 (Webcutter program; <http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/>)으로 하였다. 서던 하이브리다이제이션 (Southern hybridization)을 실행하기 위해 프로브(probe)에 이용할 DNA는 중합효소연쇄반응을 이용하여 만든 산물(351bp)를 8% 페이지(PAGE) 5 젤(gel)에서 전기영동 후, 젤 일렉트로-일루션(gel electro-elution)을 이용하여 얻었다. 이를 무작위 프라이머 표지 키트(Random primer labelling kit, Life Technologies, USA)를 이용하여 프로브(α - 32 P[dCTP])를 만들었다.

GT BAC DNA를 준비하기 위해, 3번째 풀에서 1ul의 클론된 대장균을 3ml LB 브로쓰(broth)(CM+)에 접종하여 37℃에서 300rpm으로 12시간 배양, 10 500ml LB 브로쓰(CM+)에 재접종하여 같은 방법으로 16시간 배양하였다. 쿼아젠(QIAGEN) 대형-구조 키트(Large-construct kit; Qiagen, Germany)를 이용하여 순수한 BAC DNA를 얻었다. 돼지 GT DNA(5ug)를 10 유닛(unit)의 제한효소(EcoR I, Hind III, BamHI, and Not)로 3시간 동안 절단한 후 1% 아가로스 젤에 50V로 12시간 전기영동 하였다. 전기영동한 젤을 변성화 용액 15 (denaturation solution; 0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에 15분간, 중성화 용액 (Neutralization solution; 0.5M Tris-Cl, 1.5M NaCl, pH 8)에 같은 시간동안 담근 후, 진공 전달기(vacuum transfer)를 이용하여 DNA를 나이론 막(nylon membrane)에 옮겼다. 이 막을 3시간 프리하이브리다이제이션 (prehybridization) 시킨 후, 16시간 하이브리다이제이션(hybridization)을 시 20 켜었다. 이 막을 엑스레이 필름에 노출시켜 절단된 BAC 단편을 동정하였다.

서브클론(subclone)을 만들기 위해 벡터(pUC 19)를 절단효소(EcoR I)로 1시간 반 동안 절단시킨 후, 페놀/클로로폼(phenol/chloroform)으로 순수화

시켜 -20℃에 보관하며 사용하였다. 절단된 BAC DNA 와 벡터(100ng), 10배
합성 중합제(ligation buffer), 2ul T4 중합효소(ligase; 10 unit/ul)를 튜브에 넣
은 후 15-16℃에서 16시간 이상 배양하였다. 그 후 C-세포(competent cell)
200ul에 중합 혼합액(ligation mixture) 10ul를 첨가하여 30분간 얼음에서 놓
5 아 둔 뒤, 42℃에서 90초간 열 충격(heat shock)을 시키고 800ul LB 브로쓰를
첨가하여 45분간 37℃ 배양기에서 배양하였다. 이 혼합액과 IPTG와 X-gal이
도말 된 LB 플레이트(Amp+)에 도포하여 37℃ 배양기에서 하룻저녁 배양하였
다. 다음 날 색선별(color selection)을 통해 흰색균(white colony)를 골라서
배양한 후 중합효소연쇄반응을 통하여 원하는 단편이 삽입되었는지 확인하였
10 다.

맵핑(Mapping)을 수행한 결과 Bam HI을 제외한 나머지 효
소(EcoRI, Hind III, Not I) 부위가 돼지 GT 엑손9 에는 존재하지 않음을 알았
다. 그리고, BAC DNA를 각각의 제한효소(EcoR I, Hind III, Bam HI, Not I)로
절단하여 1% 아가로스 젤런팅 한 결과 다양한 크기의 DNA 밴드를 볼 수 있
15 었다(도8). 이 젤로 서던 하이브리다이제이션(southern hybridization)을 시행
한 결과 GT 엑손 9을 포함하고 있는 DNA 단편이 Bam HI을 제외한 모든 제
한효소는 단일 밴드를 나타냈고, 그 단편은 8-12kb사이에 위치하였다.
EcoR I으로 자른 DNA 절편은 약 8kb의 크기로 GT 엑손9을 포함하고 양쪽의
인트론 부위를 8kb 정도 포함할 수 있는 크기여서 돼지 BAC DNA를 EcoRI으
20 로 자른 후 서브클로닝을 하였다. 상기에서 분리된 GT 유전자 클론을 이용하
여 유전자 적중용 벡터를 작성하였다. 적중된 세포의 선별 효율을 높이기 위해
적중 벡터는 외인성 프로모터를 가지지 않도록 즉 프로모터 트랩(promoter

trap) 방법을 이용하였다. 서브클론된 GT 유전자(1 μ g)를 3유니트(unit)의 Ava I 과 Dra III 제한 효소로, 푸로 카세트(puro cassette)를 포함하는 플라스미드 (Clontech 사)를 Hind III 와 Bam HI 제한효소로 37℃에서 2시간 이상 반응시켜 절단한다. 절단된 유전자를 dNTP와 크레노우 단편 DNA 폴리머레이즈 (Klenow fragment DNA polymerase)를 이용하여 무딘끝 (blunt end)을 가지도록 하였다. 순수화를 위해 1% 아가로스젤상에서 전기영동한 후 겔내에 있는 유전자를 DNA 일루션 키트(elution kit) (Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다. 분리된 GT 유전자 단편과 푸로마이신 저항유전자 발현부위-SV 40 폴리(A) 유전자 절편을 중합효소를 이용하여 라이게이션(ligation)하여 적중용 벡터를 작제하였다.(도9).

실시에 4; GFP 유전자와 GT 제거된 유전자의 도입 및 적중

세포가 완전 증식된 60mm 배양 디쉬에서 세포 배양액을 제거한 뒤 인산완충생리식염수로 1회 세정하였다. 이후 0.25% 트립신-EDTA를 적용하고 10%의 소태아혈청이 첨가된 세포배양배지 2ml에 세포를 재부유 시켜 35mm 배양 디쉬에 태아 섬유아세포를 도포하였다. 다음 날 50-90%의 세포 밀도가 확인되면 유전자를 도입시켰다.

본 발명에서 퓨진6의 경우, 35mm 디쉬당 DNA양은 1 μ g, 유전자 도입액 용량을 3.0 μ l로 하여 유전자를 도입하였다. 35mm 디쉬 하나를 기준으로 에펜도르프 튜브에 97 μ l의 혈청을 첨가하지 않은 세포배양배지를 분주하였다. 1 μ g의 pEGFP-N1벡터를 넣은 후 퓨진6을 3 μ l 넣고 3000rpm에서 10초간 원심하였다. 원심 후 15분간 실온에서 방치한 다음 35mm 배양 디쉬에 100 μ l씩

분주하여 잘 흔들어 골고루 확산되게 한 다음 세포배양기에서 배양하였다. 양전하 리포좀을 이용하는 방법인 리포펙트아민 플러스(LipofectAmin plus, Life Technologies)는 적은 양의 DNA로도 높은 유전자 도입율을 얻을 수 있는 장점이 있다. 먼저, 인산완충생리식염수, 소태아혈청 및 항생제가 첨가되지 않은 배지를 30분전에 37℃ 항온수조에 담가놓고 클린벤치내에서 멸균 에펜도프 튜브에 DNA를 혼합한다. 혈청이 첨가되지 않은 배지 또는 옵티 엠.이.엠 (Opti-MEM) 100 μ l 와 플러스 리에전트(Plus reagent) 4 μ l를 혼합하여 이를 DNA와 잘 혼합한(피펫 사용) 후 15분간 실온에 정치시켰다. 정치하는 동안 90% 의 세포밀도를 지닌 6웰 플레이트(well plate)를 인산완충생리식염수로 2회 세척하였다. 혈청을 첨가하지 않는 배지를 웰당 0.8ml 씩 가한 후 DNA 혼합액을 각 웰에 넣고 디쉬를 가볍게 흔들어 골고루 섞은 다음 CO₂ 배양기에서 배양한다. 양전하 중합체 제제인 엑스젠 500(ExGen 500, MBI Fermentas)은 최적화 작업을 통해 100 μ l의 150mM NaCl에 2 μ g의 벡터 DNA을 넣은 후 6.6 μ l 엑스젠 500을 넣고 10초간 3000rpm으로 원심한 뒤 실온에 10분간 정치하고 60%의 세포밀도를 가진 35 mm 배양 디쉬에 분주한 후 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

실시예 5: GFP 유전자가 도입된 핵공여세포의 선별, 증식 및 동결보존

각기 다른 3가지 방법으로 유전자를 도입시킨 돼지 태아섬유아세포를 3-5일간 배양하여 완전증식 시킨 후 효소처리로 단세포로 분리하였다. 이와같은 단세포 중 현미경하에서 자외선 필터를 이용하여 GFP 단백질이 발현되는 세포만을 선택하여 핵이식에 적용한다. 또한 항생제를 이용한 세포선별을 위해

유전자 도입 후 4-5일 간격으로 3주간 네오마이신을 400ug/ml 용량으로 적용하여 선별을 실시한다. 선별 후 세포들은 하나의 집락(colony)으로 자라게 되는데 이를 트립신으로 처리하여 96-웰(96-well)의 배양용기로 옮겨 배양 한 후 이들이 증식되면 이후 24-웰로 옮겨 배양하고 더 나아가서 12-웰과 6-웰

5 까지 증식 배양을 실시하였다. 일정 수 이상 배양된 세포의 게노믹 DNA(genomic DNA)를 분리하여 염색체상에서 GFP 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위해 5'-GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA-3', 5'-GAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGAT-3'의 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응법과 GFP 프로브를 이용한 서던 블랏(Southern blotting)을 통해 선별

10 된 세포의 GFP 유전자 도입 여부를 확인하였다. GFP유전자 도입과 항생제 선별이 끝나 증식배양된 세포를 15 % 소태아혈청과 10 % 세포배양배지를 이용하여 세포를 부유한 다음 4℃에서 2시간, -70℃에서 12시간 이상 정치시킨 후 -150℃에서 동결보관하였다. 이후 동결된 세포를 이용하여 체세포 핵이식을 실시하였다.

15

실시예 6: 수핵난자의 준비

도축장에서 채취한 도축돼지의 난소로부터 18 게이지 주사침이 장착된 5ml 주사기를 사용하여 직경 3-6mm 내외의 난포를 흡입한 다음, 1cm 간격의 격자 눈금을 그은 100mm 디쉬에 흡입한 난포액을 옮겨 난구세포가 충분히

20 부착되어 있고 세포질이 균질한 난자를 선별하였다. 선별된 난자를 NCSU23-W가 2ml씩 분주된 35mm 디쉬에서 3회에 걸쳐 세정하고, NCSU23-M으로 최종적으로 세정한다. 그후 소혈청알부민이 첨가되지 않은

NCSU23-M에 10% 돼지 난포액, 성선 자극 호르몬, 10ng/ml의 표피성장인자를 첨가하여 4-웰 디쉬에 480 μ l씩 분주하였다. 각각의 웰에 미성숙 난자를 50-60개씩 넣고 5% CO₂의 조건하에 22시간 동안 배양한 후 상기한 호르몬이 첨가되지 않은 NCSU23-M에서 20-22시간 동안 체외성숙시켰다.

5

실시에 7: 체세포 핵이식

실시에 4에서 준비된 수핵난자를 NCSU23-W 배양액에서 1회 세정하고 0.1% 하일알루로니다제가 첨가된 NCSU23-W 용액 내에 옮긴 다음 난구 세포를 제거하였다. 이어 7.5mg/ml의 농도가 되도록 다이메틸설폭사이드 (DMSO; dimethyl sulfoxide)에 사이토칼라신 B(cytochalasin B, Sigma Chemica Co.,USA)를 용해시킨 용액 1 μ l와 10% 소태아혈청이 첨가된 NCSU23-W를 1ml을 혼합한 사이토칼라신 B 용액으로 난자를 옮겼다. 미세조작기로 수핵난자를 고정하고 투명대를 관통하여 고정용 피펫과 마찰을 가해 절개창을 형성시킨 후, 난자 상부에서 미세피펫으로 전체 양의 10 내지 15%에 해당하는 세포질을 압박압력을 가해 제거함으로써 난자에서 탈핵시켰다(스퀴징 탈핵, squeezing법).

탈핵후 미세조작기에서 탈핵된 수핵난자에, 준비된 핵공여세포를 이식하였다. 먼저, 5mg의 피.에이치.에이-피(phytohemagglutinin; PHA-P)를 10ml의 NCSU23-W에 용해시킨 용액 100 μ l와 400 μ l의 NCSU23-W에 혼합한 용액으로 작업용 디쉬 상단 중앙에 4 μ l의 이식용 미소적을 만든다. 그 후 0.5% 소태아혈청이 첨가된 PBS로 이식용 미소적 위 아래에 각각 1개씩의 4 μ l의 핵공여세포용 미소적을 만든다. 이들 미소적을 미네랄 오일로 도포한 후, 작업용

디쉬를 미세작업판에 위치시킨다. NCSU-M에 정치된 탈핵 난자를 세정용 NCSU-W로 3회 세정하고, 이식용 미소적으로 이동시킨 다음, 이식용 피펫을 사용하여 공여세포를 이식용 미소적으로 이동시킨다. 이식용 피펫에 GFP 발현이 확인된 세포 또는 GT 유전자가 제거된 세포를 주입하여 이 세포를 수핵난자의 주란강에 주입하였다(도3). 이런 과정을 거쳐 형성시킨 핵이식란을 NCSU-W로 옮겨서 3회 세정 후, 정치시켰다.

실시예 8: 세포융합 및 활성화

비티엑스 세포조작기를 사용하여 핵이식란의 전기융합 및 활성화를 실시하였다. 만니톨 용액(참조: 표 4) 15 μ l를 세정용 마우스 피펫으로 핵이식란이 들어있는 NCSU23-W에 첨가하고, 1분간 정치시켰다. 세정용 마우스 피펫을 사용하여 핵이식란을 NCSU23-W가 첨가된 만니톨 용액에 주입하여 다시 1분간 정치시키고, 세정용 만니톨 용액에 넣었다. 이어, 비티엑스 세포조작기에 연결시킨 만니톨이 들어있는 전극 용기에 핵이식란을 넣고 공여세포가 (+) 전극을 향하도록 핵이식란을 위치시켰다. 핵이식란의 세포 융합은 1.8kV/cm의 직류전압에서 30 μ s의 시간으로 1회 통전하는 조건을 설정함으로써 유도하였다. 전기자극 후 20분 이내에 현미경하에서 세포융합여부를 확인하여 융합되지 않은 핵이식란은 재차 융합을 시도하였다. 세포융합이 확인된 핵이식란은 NCSU23-W로 옮겼다.

【표 4】

Mannitol

성분	농도
Mannitol	280mM
HEPES	0.5mM
CaCl ₂	0.1mM
MgSO ₄	0.1mM
BSA	0.05%(w/v)

실시예 9: 핵이식란의 배양

- 5 세포융합과정이 끝난 형질전환 핵이식란은 NCSU23-W로 활성화 후 NCSU23-D로 옮겨 배양하였다. 그 후 배양 4일째 NCSU23-D에 소태아혈청이 10%가 되도록 첨가한 배지에서 배양하였다. 이와 같은 과정을 통해 발육된 각각의 형질전환 핵이식란은 배양 7일째에 배반포로의 발육여부와 GFP 발현 핵이식란의 경우 자외선하에서 발현 여부를 확인하였다(도4).

10

실시예 10: 핵공여세포의 GFP 도입여부에 따른 핵이식란의 발육성적비교

- 핵공여세포의 GFP 도입(GFP-transfection) 여부에 따른 핵이식란 발육성적의 차이를 비교하기 위해 실시예 4에서 GFP를 도입한 핵공여세포와 그
 15 령지 않은 정상체세포를 실시예 6, 실시예 7, 실시예 8 및 실시예 9의 방법으로 체세포 핵이식하여 분할율, 배반포로의 발육률 및 배반포 세포수를 비교하였다(참조: 표 5). GFP 도입여부는 핵이식란의 발육성적에 유의적인 차이를 초

래하지 않았다.

【표 5】

GFP 트랜스펙션 여부에 따른 핵이식란의 발육성적 비교

GFP 도입	융합난자수	분할율(%)	배반포발육율(%)	배반포세포수
도입	5031	2388(47.5)	357(15.0)	44.3±15.1
비도입	6681	3106(46.5)	437(14.1)	46.3±6.4

5 실시예 11: 공여핵의 GFP 도입방법에 따른 핵이식란의 발육성적 비교

GFP 도입 방법에 따른 핵이식란의 발육율을 비교하기 위해, 실시예 4에서 3가지 방법으로 GFP를 핵공여세포에 도입하고 실시예 6, 실시예 7, 실시예 8 및 실시예 9의 방법으로 체세포 핵이식하여 이들의 분할율, 배반포로의 발육률 및 배반포 세포수를 비교하였다(표 6). GFP 도입방법에 따라 핵이

10 식란의 발육성적에 유의적인 차이를 초래하지 않았다.

【표 6】

GFP 도입 방법에 따른 핵이식란의 발육성적 비교

도입방법	융합난자수	분할율(%)	배반포율(%)	배반포세포수
정상세포	6681	3106(46.5)	437(14.1)	47.4±13.1
리포펙타민	1041	502(48.2)	70(13.9)	53.3±11.3
퓨진 6	2967	1401(47.2)	221(15.7)	54.4±12.7
엑스진 500	1023	485(47.4)	67(13.8)	46.3±6.4

실시예 12: 핵이식란의 대리모에의 이식

15 실시예 1에서 실시예 11까지 과정에 의해 생산된 GFP 유전자 도입 및

GT유전자가 제거된 핵이식란의 대리모 이식을 위한 수란돼지는 산과학적 질병에 이환되지 않고 정상적인 발정주기가 반복되는 암돼지 중에서 자궁상태가 정상인 개체를 대상으로 선발하였다.

체외배양과정에 있는 양질의 형질전환 핵이식란을 선별하여 20%의 소
5 태아혈청이 첨가된 인산완충생리식염수와 함께 수란 돼지의 난소쪽 난관 2cm
부위에 주입하였다(도5). 그 과정을 요약하면, 수란돼지의 마취는 전마취제로
황산아트로핀(atropine)을 1mg/kg의 용량으로 근육주사한 뒤 진정제인 아자페
론(Azaperone; Stresnil, P/M; Mallinckrodt)을 2-4mg/kg 용량으로 근육 내
주사하였다. 10분 뒤 20mg/kg 의 염산 케타민(ketamine HCl)을 근육 주사하
10 여 마취를 유도하였다. 피부 절개부 주위에 대한 국소마취는 2% 리도카인
(lidocaine)으로 주사하였다. 일반적인 개복수술법에 따라 복부의 정중선을 따
라 7cm 정도 절개하며 절개창의 혈액이 복강 내로 유입되지 않도록 하였다.
손으로 복강 내를 촉진하여 난소와 난관 및 자궁을 절개창으로 견인하였다. 견
인된 난소의 난소간막을 조심스레 다루어 난관의 개구부를 인지하여 1.0ml의
15 튜버쿨린(tuberculin) 주사기(Latex free, Becton Dickinson & CO. Franklin
lakes, NJ 07417)가 장착된 톰캣카테타(Tom cat catheter, 50cm, 5 French,
open ended catheter, Williams A Cook, , MO 63103)를 난관 내로 2cm 정도
삽입하였다(도5). 삽입된 카테터의 전방에 충분한 공간을 확보하고 핵이식란을
주입하였다. 핵이식란의 완벽한 주입 여부는 현미경으로 검경하고 항생제를 섞
20 은 생리식염수 500ml을 복강 내 주입하였다. 복부의 봉합은 흡수성 봉합사를
이용하고 이후 피부봉합을 실시하였다. 수술 후 감염을 방지하기 위해 광범위
항생제를 5일간 투여하였다.

실시에 13; 임신 감정 및 GFP 유전자 도입 및 GT 제거된 산자의 출

산

핵이식란의 대리모 이식 후 4주째에 초음파 검사 방법으로 임신여부를 확인하였다.

- 5 임신 확인 후에도 2주 간격으로 초음파검사로 임신 지속여부를 관찰하였다. 임신된 GFP 발현 복제돼지는 핵이식란 이식 후 114일에 7두가 태어났으며 GT 제거된 복제돼지는 이식 후 114일에 3두가 태어났다.

실시에 14; 각각의 형질전환 복제돼지의 유전자 확인

- 10 실시에 13에서 생산된 각각의 형질전환 산자는 육안적 방법 및 분자생물학적 방법으로 유전자 분석을 하였다. GFP 발현 복제돼지는 외견관찰 및 조직을 이용한 서던블랏, 웨스턴 블랏 및 세포배양을 통하여 GFP 발현 및 유전자 도입을 분석하였다. GFP의 발현 여부는 육안적으로 산자의 피부조직, 구강조직, 혀 등을 관찰하여 초록빛이 나타나는지를 조사하였다. 분자생물학적 검
- 15 사로는 서던블랏으로 산자의 게놈 DNA를 분석하였으며 웨스턴블랏으로 산자 조직의 단백질을 분석하여 GFP 발현 복제돼지임을 확인하였다. 이후 산자의 조직을 실시에 1의 방법으로 배양하여 세포주를 확립한 후 현미경의 자외선 필터를 이용하여 GFP 단백질이 발현됨을 확인하였다. GT 제거된 복제돼지의 유전자 분석은 분자생물학적 방법으로 서던블랏으로 산자의 DNA를 분석하
- 20 여 GT 제거된 복제돼지임을 확인하였다.

이상에서와 같이, 본 발명은 체세포에서 GFP유전자를 도입 또는 GT 유전자 제거시킨 후, 상기 체세포를 핵이식 복제기술을 접목하여 GFP유전자가

발현되는 돼지 또는 GT 제거된 돼지를 제공함으로써, 질환모델동물의 생산가능성 및 초급성 면역거부반응없이 인체에 이식 가능한 장기공급 동물의 생산가능성을 제공한다.

- 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 이
- 5 분야의 통상의 지식을 가진 자에 있어서, 이러한 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

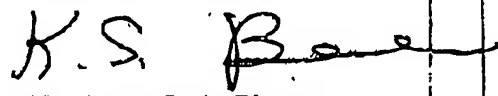
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1

TO: HWANG, Woo Suk
College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
#San 56-1, Shinlim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742,
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: SNU-P2 (swine embryo)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: KCTC 1014EBP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December 27 2001 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejeon 305-383, Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority of authorized official(s):  BAE, Kyung Suk, Director Date: December 29 2001

Form DA/4 (KCTC Form 17)

KCTC 1014


BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL REGISTRATION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : HWANG, Woo Suk
College of Veterinary Medicine, Seoul National University,
#San 56-1, Shinlim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151 742
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: SNU-P1 (swine embryo)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 10145BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December 27 2001 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) #52, Oun-dong, Yuseong-ku, Taejeon 305-383, Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or authorized official(s):  BAE, Kyung Sock, Director Date: December 29 2001

Form 10/94 (ICCTC Form 17)

w/10/94/21

【청구의 범위】**【청구항 1】**

(a) 돼지에서 채취하여 배양한 세포주를 핵공여세포로 준비하는 단계;

- (b) GFP 유전자를 포함하는 DNA 구조체와 리피드 성분 또는 비리피드
- 5 양전하 폴리머 매개체를 혼합하여 리피드(또는 양전하 폴리머)-DNA 구조 복합체를 형성시킨 후, 상기 리피드 (또는 양전하 폴리머)-DNA 구조 복합체를
- 상기 핵공여 세포배양액에 첨가 후 배양하여 상기 GFP 유전자를 상기 핵공여 세포에 도입하여 발현시키는 단계;

- (c) 상기의 GFP 유전자가 도입된 핵공여 세포를 탈핵된 돼지 수핵난에
- 10 이식하여 형질전환된 핵이식란을 생산하고, 활성화시키는 단계; 및

(d) 상기 핵이식란을 대리모에 이식하여 산자를 생산하는 단계를 포함하는 GFP 유전자가 도입된 돼지를 생산하는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

- 15 (a)단계의 세포가 돼지의 태아에서 분리한 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

- (b)단계의 돼지 GFP 유전자를 포함한 DNA 구조체가 pEGFP-N1인 것
- 20 을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

(b)단계의 리피드 성분이 퓨진6 또는 리포펙트아민 플러스인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

5 (b)단계의 비리피드 양전하 폴리머 성분이 엑스젠 500인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제1항의 (a) 내지 (c)단계의 방법으로 제조된 돼지의 핵이식란 에스엔
유-피1(돼지 엔티 엠브리오)(SNU-P1[Porcine NT embryo]), KCTC 10145
10 BP.

【청구항 7】

제1항의 (d)단계의 방법을 수행하여 제6항의 에스엔유-피1(돼지 엔티
엠브리오)(SNU-P1[Porcine NT embryo])로부터 생산된 GFP 유전자를 발현
하는 복제돼지.

15 【청구항 8】

(a) 돼지에서 채취하여 배양한 세포주를 핵공여 세포로 준비하는 단계;

(b) 돼지 게놈 BAC 라이브러리로부터 GT 유전자 클론을 분리한 후,
상기 GT 유전자 클론을 이용하여, GT 유전자의 단백질발현부위 일부분에서
상동재조합을 통하여 GT 단백질 발현부위를 표지 유전자로 대체하여 정상적
20 인 GT 단백질이 발현되지 않도록 하는 유전자 적중용 벡터를 작제하는 단계;

(c) 상기의 유전자 적중 벡터를 리피드 또는 비리피드 성분과 혼합하여
복합체를 형성시킨 후, 상기 복합체를 상기 핵공여 세포배양액에 첨가하여 상

기 재조합 GT 유전자를 핵공여 세포내에 도입하여 적중시키는 단계;

(d) 상기 재조합 GT 유전자가 도입된 핵공여 세포를 탈핵된 돼지 수핵
난에 이식하여 형질전환된 핵이식란을 생산하고, 활성화시키는 단계; 및

(e) 상기 핵이식란을 대리모에 이식하여 산자를 생산하는 단계

5 를 포함하는 것을 특징으로 하는 GT 유전자가 제거된 돼지를 생산하는 방법.

【청구항 9】

제8항에 있어서,

(a)단계의 세포가 돼지의 태아에서 분리한 섬유아세포인 것을 특징으로
하는 방법.

10 **【청구항 10】**

제8항에 있어서,

상기 벡터가 외인성 프로모터를 가지지 않도록, (b)단계에 프로모터 트
랩 방법이 더 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

15 제8항에 있어서,

(b)단계의 상기 유전자 적중용 벡터가

GT 유전자 중 인트론8의 일부분, 엑손9(단백질 발현부위) 및 인트론9
의 일부 서열을 포함하는 상동절편을 포함하며, 상기 GT 유전자의 단백질 발
현부위 중 DraIII 제한효소 및 SacI 제한효소로 절단된 단편의 아미노산 서열
20 에 해당하는 유전자의 염기서열이 푸로마이신 저항유전자 발현부위-SV40 폴
리(A)서열로 대체되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제8항에 있어서,

(c)단계의 리피드 매개체가 퓨진6인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제8항의 (a) 내지 (d)단계의 방법으로 제조된 돼지의 핵이식란 에스엔
5 유-피2(돼지 엔티 엠브리오)(SNU-P2[Porcine NT embryo]), KCTC 10146
BP.

【청구항 14】

제8항의 (e) 단계의 방법을 수행하여 제13항의 에스엔유-피2(돼지 엔
티 엠브리오)(SNU-P2[Porcine NT embryo])로부터 생산된 GT 유전자가
10 제거된 복제돼지.

【청구항 15】

GT 유전자 중 인트론8의 일부분, 엑손9(단백질 발현부위) 및 인트론9
의 일부 서열을 포함하는 상동절편을 포함하며, 상기 GT 유전자의 단백질 발
현부위 중 DraIII 제한효소 및 SacI 제한효소로 절단된 단편의 아미노산 서열
15 에 해당하는 유전자의 염기서열이 푸로마이신 저항유전자 발현부위-SV40 플
리(A)서열로 대치된 벡터.

【요약서】

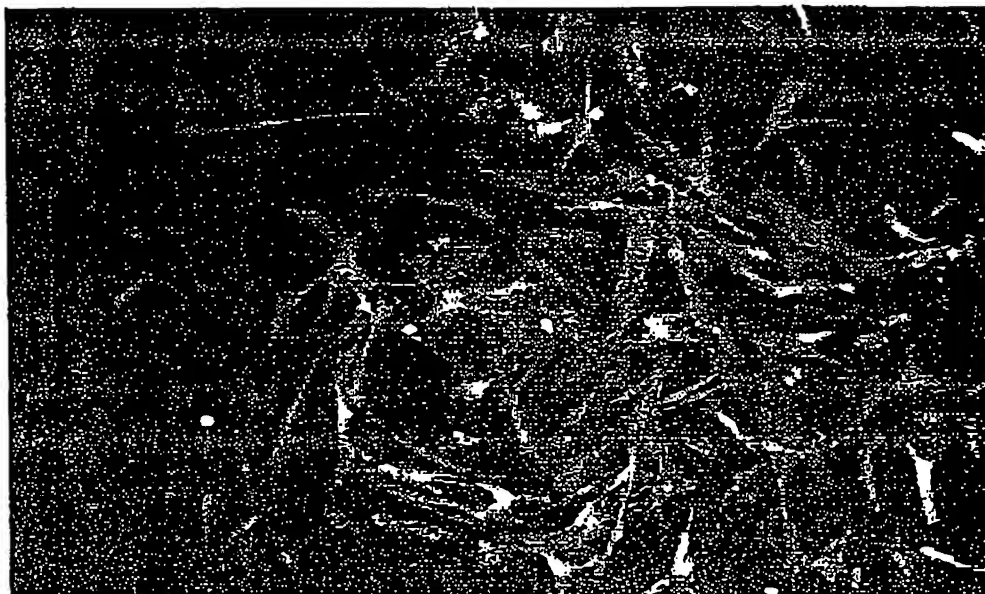
【요약】

The present invention relates to GFP-transfected cloned pigs, GT knock-out cloned pigs and methods of production thereof. The method
5 for producing GFP-transfected cloned pig and GT knock-out cloned pig comprises steps of establishing somatic cell lines ; preparing GFP-transfected donor cells or GT Knock-out donor cells ; producing transfected NT embryos using the donor cells and recipient oocytes ; and
transferring the transfected NT embryos into surrogate pig. The organs
10 of the knock-out cloned pig according to the present invention can be used for the xenotransplantation without hyperacute xenograft rejection.

10/500748

【도면】

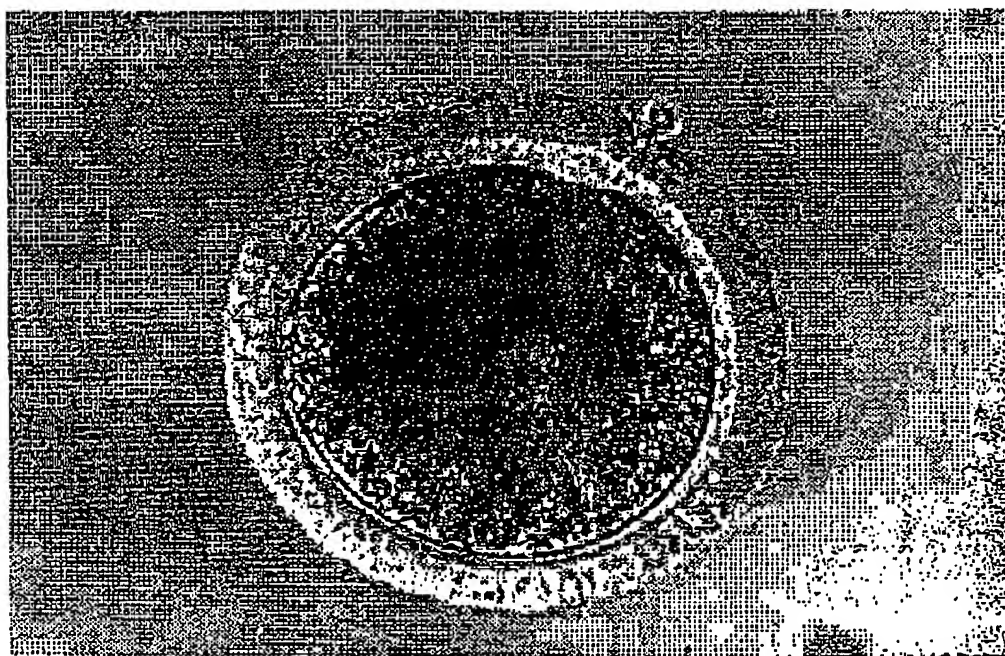
【도 1】



1/9

10/500748

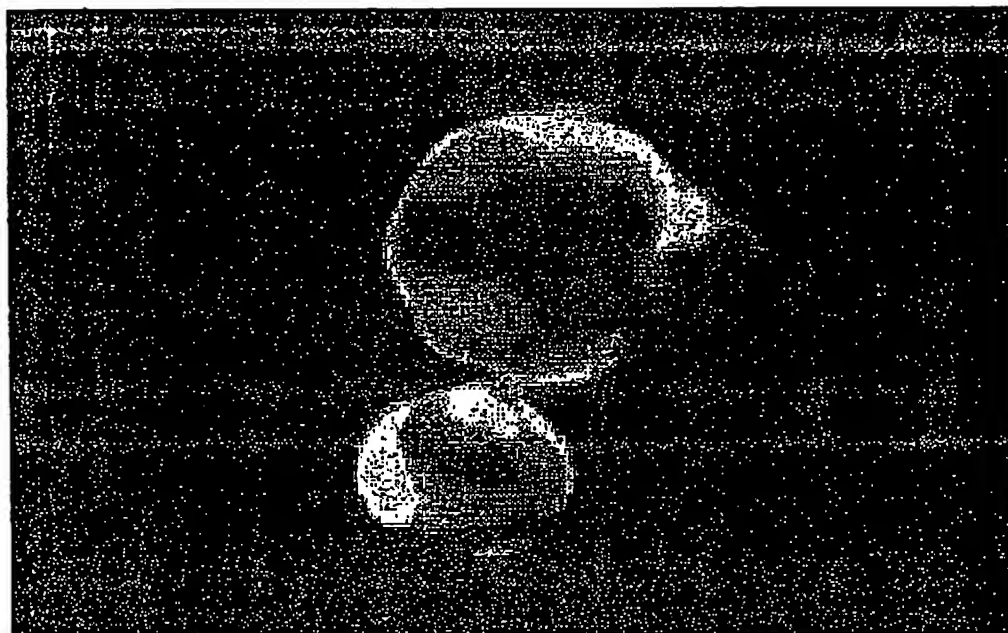
【E 2】



2/9

10/500748

【도 3】



3/9

10/500748

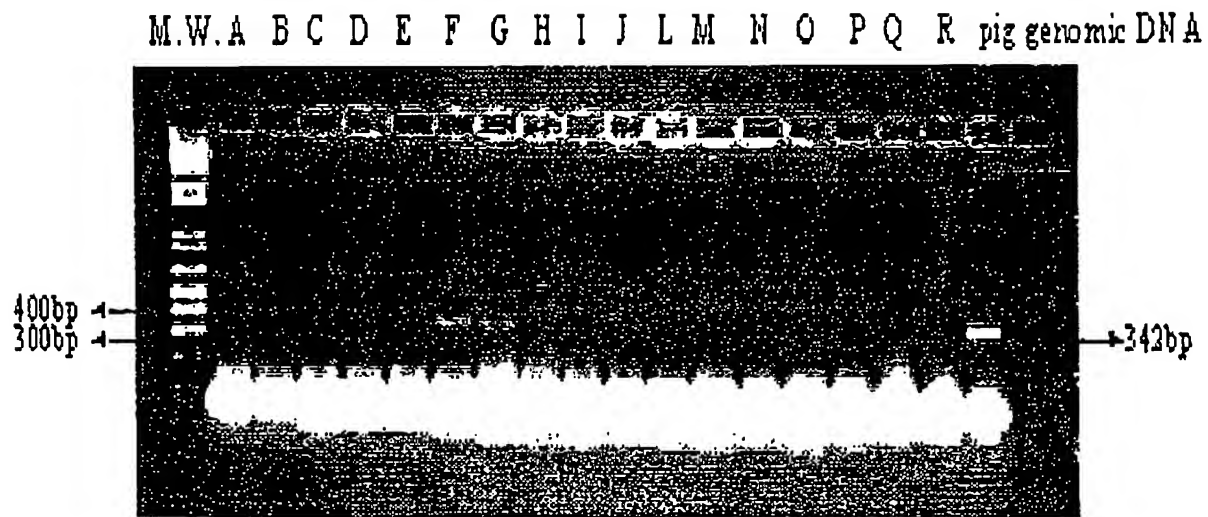
【图 4】



4/9

10/500748

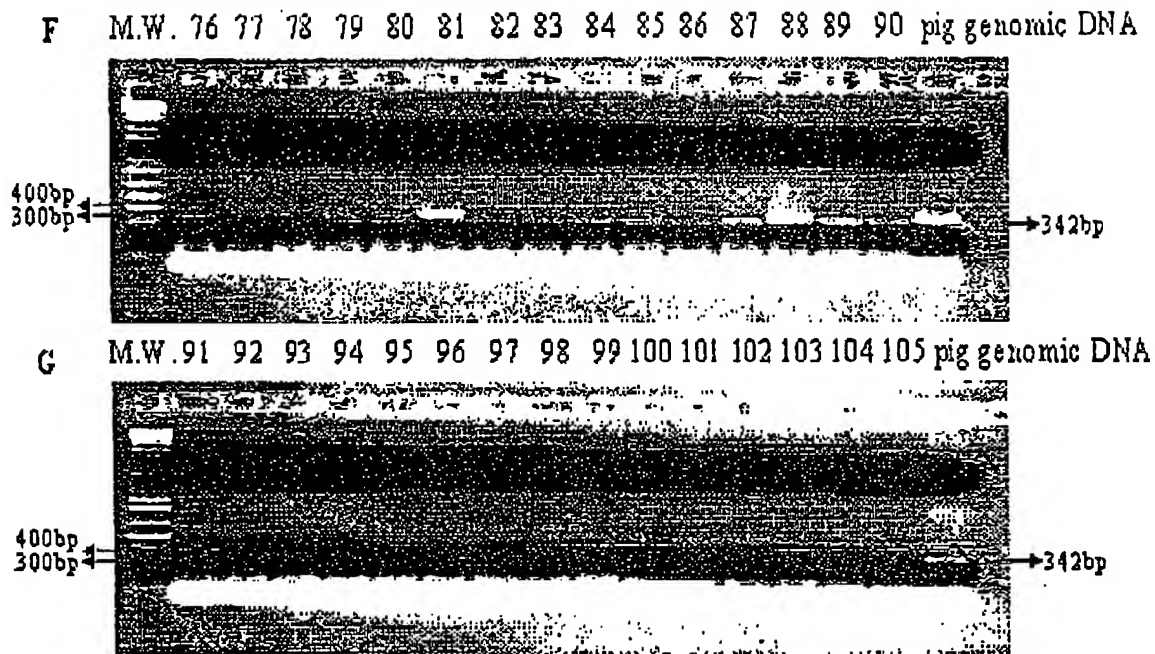
【도 5】



5/9

10/500748

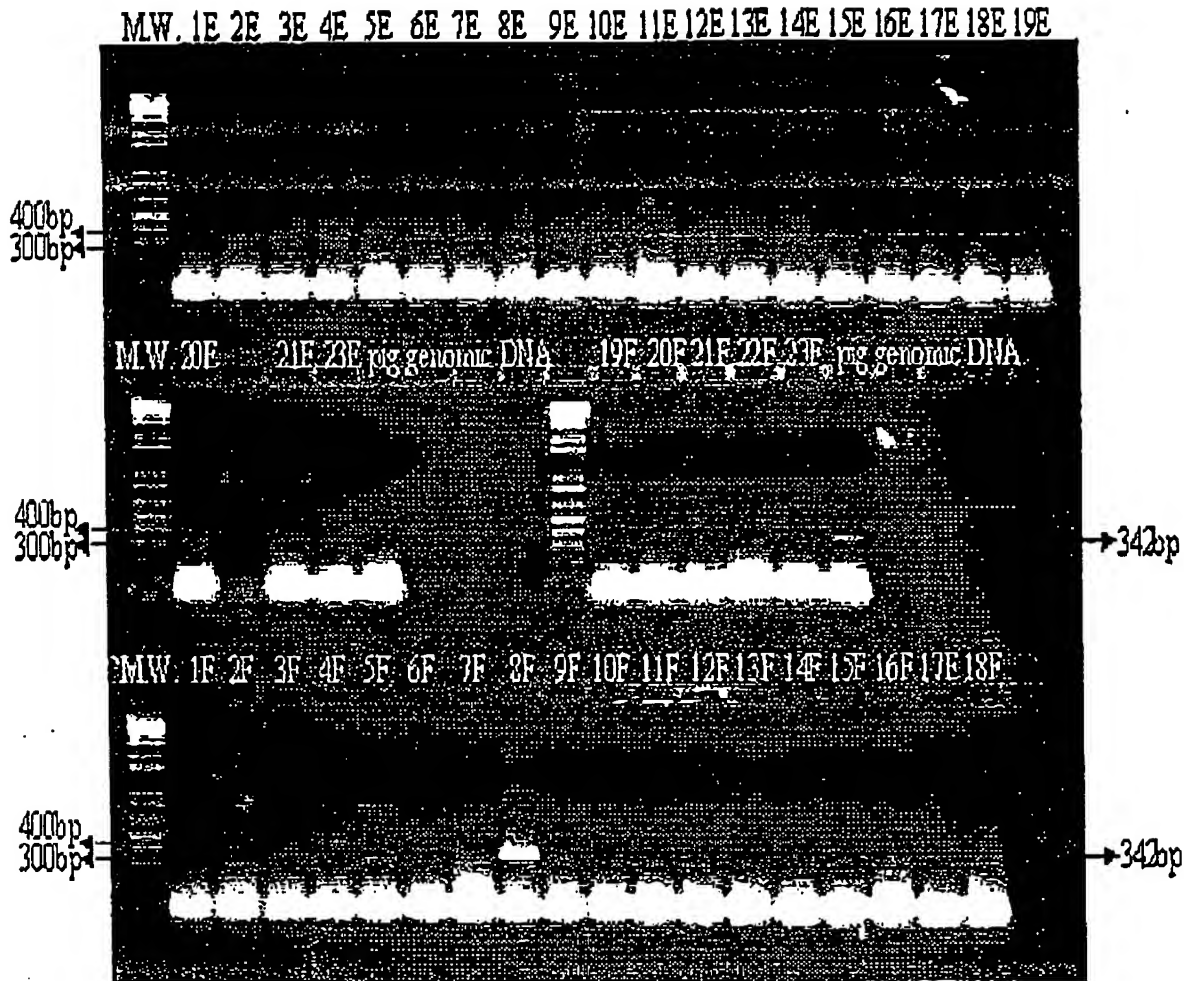
【도 6】



6/9

10/500748

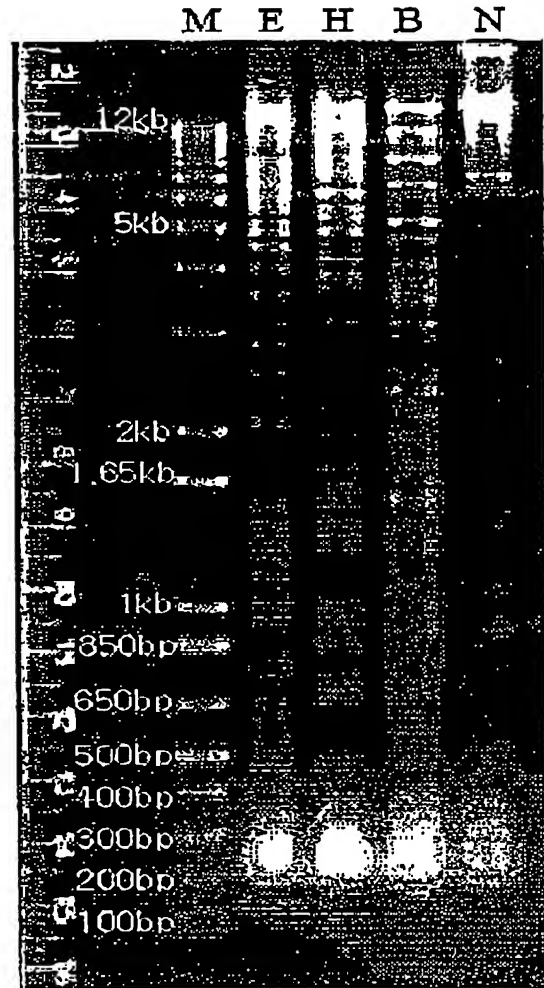
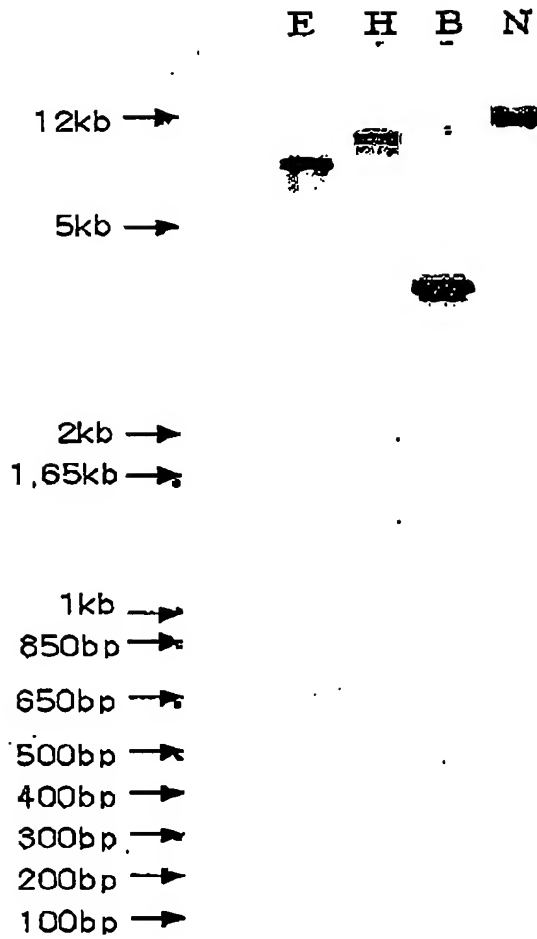
【도 7】



7/9

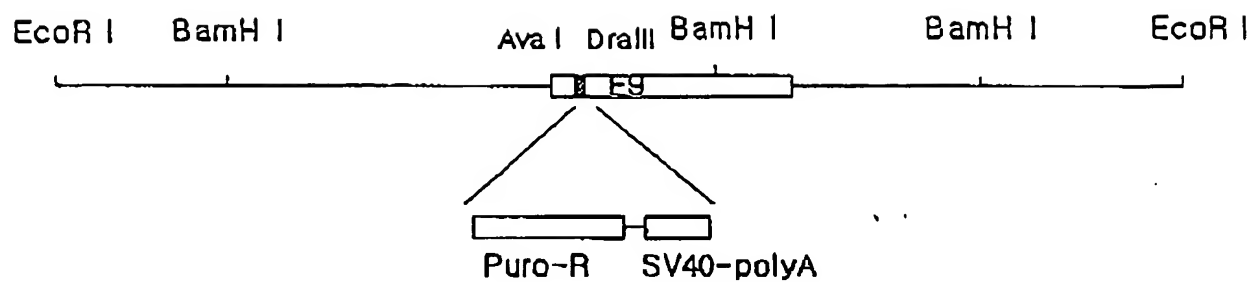
10/500748

【도 8】



10/500748

【도 9】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.